

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 31420131150124

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

仿生结晶法制备纳米药物晶体及其形成机制研究

Preparation and formation mechanism of nano-crystalline
drug by a biomimetic crystallization pathway

黄 域

指导教师姓名: 侯振清 教 授

姜 源 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2016 年 月

论文答辩时间: 2016 年 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

现有的新药开发过程中，大量的候选药物因其体内生物利用度低，而无法得到最终的开发应用。近年来，已有众多研究表明将难溶性药物制成纳米晶体的形式可以有效改善其生物利用度，并且纳米药物晶体制备工艺具有安全、快捷、能耗低及给药途径多等优势，已成为难溶性药物给药系统研究的新热点，拥有实际生产意义和广阔的应用前景。本论文立足于运用仿生结晶手段制备纳米药物新剂型，以提高其生物利用度为目的。选取吡哆美辛（INN）作为模型药物，聚乙烯吡咯烷酮（PVP K30）和聚乙烯亚胺（PEI₆₀₀）为高分子辅料；采用反溶剂沉淀法，制备了高纯度的“哑铃”状和“海胆”状超结构的吡哆美辛微球，其平均载药量在 60% 以上，并通过体外释药实验证实了运用仿生结晶手段制备的药物晶体相比于原料药具有更好的溶出特性。同时，本课题利用偏光显微镜、扫描电子显微镜和拉曼光谱仪等技术对吡哆美辛/聚乙烯吡咯烷酮（INN/PVP）和吡哆美辛/聚乙烯亚胺（INN/PEI）乙醇结晶体系进行了时间分辨追踪，成功捕捉到吡哆美辛结晶过程中无定型液态前驱体的形成及其晶化转变的全过程；并系统的研究了添加剂在药物小分子非经典结晶过程中的作用，揭示了吡哆美辛结晶生长的多步转变机制。此外，本文还通过对左旋组氨酸/聚丙烯酸（L-His/PAA）结晶体系进行了细致的时间分辨实验，发现了其结晶过程中也存在着液态前驱体区域，佐证了溶液相中聚合物诱导的有机物结晶路径是以液态前驱体区域作为异相成核点，通过直接地质量传递，最终转变为纳米晶体超结构的过程。这些结果不仅丰富了溶液相中有机物的非经典多步结晶理论，也为探寻液态前驱体和其它前驱体间的联系提供了理论支持。另外，仿生结晶法制备的纳米药物具有投资小、技术简便、添加剂含量低等优势，可以实现技术转化。最后，在附章中本文采用溶剂置换法，通过调整左旋组氨酸纳米片（L-His）和聚乙烯醇（PVA）的质量比，成功制备了具有贝壳“砖墙结构”的低密度、轻质量的全有机杂化薄膜。

关键词：仿生结晶；聚电解质；无定型前驱体

Abstract

In the drug processing, many pharmaceutical candidates have to be thrown away due to their practical insolubility and low and erratic bioavailability. In recent years, there are numerous crystal engineering technology strategies for enhancing the bioavailability of drugs due to their low aqueous solubility. Engineering a poorly soluble drug into the nanocrystalline forms provides numerous routes to improve its bioavailability. So, it is of both scientific and industrial importance to develop advantageous engineering approaches, especially those safe, efficient, and green ones for drug delivery applications. Herein, we investigated a bio-inspired crystallization route to precipitate the "dumbbell-shaped" and "sea urchin" microspheres of a model drug – indomethacin (INN) with the high drug loading higher than 60%, where polyvinylpyrrolidone (PVP K30) or polyethylene imine (PEI₆₀₀) as the additive. Then, the *in-vitro* drug release experiment evidenced that microspheres composed of nanocrystalline structural subunits had enhanced solubility and the dissolution rate compared with the raw indomethacin. Importantly, the time-resolved studies with the polarized optical microscopy, scanning electron microscopy, Raman spectroscopy revealed that the precipitation was a multistage process with the appearance of amorphous precursors and their transformation into the crystalline form. In addition, a multistage process was verified in the precipitation of L-histidine/polyacrylic-acid (L-His/PAA). These results not only enrich the understanding of non-classical organic crystallization, but also build the image of the transformation from liquid precursors to superstructures of nanocrystalline subunits. Finally, in a separate study, we designed the nacre-liked, light-weight L-His/PVA hybrid thin film via adjusting the mass ratio of the L-histidine nanoplatelets (L-His) and polyvinyl alcohol (PVA) and other experimental conditions. This could be the first full organic nacre-like bio-inspired product.

Keywords: Bio-inspired crystallization; Polyelectrolyte; Amorphous precursor

目录

摘要	I
Abstract.....	II
第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 经典药物结晶方法.....	1
1.2.1 结晶基本理论.....	1
1.2.1.1 结晶过程.....	2
1.2.1.2 成核基本理论.....	2
1.2.2 制药工业上常用的结晶方法.....	7
1.3 纳米药物晶体的制备技术.....	9
1.3.1 “自上而下”技术.....	10
1.3.1.1 物理粉碎法.....	10
1.3.1.2 高压匀质法.....	11
1.3.2 “自下而上”技术.....	11
1.3.2.1 溶剂反溶剂结晶法.....	11
1.3.2.2 乳化法和微乳法.....	12
1.3.2.3 超临界流体结晶法.....	13
1.3.2.4 喷雾干燥法.....	13
1.4 仿生结晶	14
1.5 本文工作	17
第二章 聚合物诱导的吡啶美辛自组装微球结晶机理及给药系统的研究	19
2.1 引言	19
2.2 实验部分	20
2.2.1 实验仪器及材料.....	20
2.2.2 实验方法.....	22
2.2.2.1 吡啶美辛自组装微球的制备	22
2.2.2.2 吡啶美辛自组装微球结晶机理研究	22
2.2.2.3 吡啶美辛自组装微球理化性能表征	23
2.2.2.4 吡啶美辛自组装微球的释药性能研究	24
2.3 结果与讨论	26
2.3.1 吡啶美辛在不同介质中的标准曲线	26

2.3.2 吡啶美辛自组装微球形貌分析.....	27
2.3.3 吡啶美辛自组装微球的优化实验.....	29
2.3.4 吡啶美辛自组装微球结晶机理研究.....	30
2.3.5 非共价键作用力的表征.....	35
2.3.6 拉曼图谱分析.....	37
2.3.7 吡啶美辛自组装微球体外释药行为评价.....	38
2.4 本章小结	40
第三章 聚合物诱导的左旋组氨酸自组装微球的制备、表征及结晶机理研究 ...	41
3.1 引言	41
3.2 实验部分	42
3.2.1 实验仪器及材料.....	42
3.2.2 实验方法.....	43
3.2.2.1 左旋组氨酸自组装微球的制备.....	43
3.2.2.2 左旋组氨酸自组装微球结晶机理研究.....	44
3.2.2.3 左旋组氨酸自组装微球理化性能表征.....	44
3.3 结果与讨论	45
3.3.1 左旋组氨酸自组装微球形貌分析.....	45
3.3.2 左旋组氨酸结晶微球的优化实验.....	46
3.3.4 左旋组氨酸自组装微球结晶机理研究.....	48
3.3.5 非共价键作用力的表征.....	50
3.4 本章小结	51
第四章（附章） 低密度、高柔韧性全有机杂化薄膜的制备	52
4.1 引言	52
4.2 实验部分	53
4.2.1 实验仪器及材料.....	53
4.2.2 实验方法.....	54
4.2.2.1 左旋组氨酸纳米片的制备.....	54
4.2.2.2 不同配比的左旋组氨酸/聚乙烯醇复合薄膜的制备.....	55
4.2.2.3 左旋组氨酸/聚乙烯醇复合薄膜的理化性能表征.....	55
4.3 结果与讨论	56
4.3.1 左旋组氨酸纳米片的结构表征.....	56
4.3.2 不同配比的左旋组氨酸/聚乙烯醇复合薄膜的结构表征.....	56
4.3.3 非共价键作用力的表征.....	58
4.4 本章小结	59

第五章 结论与展望	60
5.1 结论	60
5.2 展望	61
参考文献	62
硕士期间发表论文	74
致谢	75

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 The classical method of pharmaceutical crystallization	1
1.2.1 The basic theory of crystallization	1
1.2.1.1 Crystallization process	2
1.2.1.2 The theory of nucleation	2
1.2.2 The methods of crystallization in pharmaceutical industry.....	7
1.3 Nano-crystal technologies for pharmaceutics.....	9
1.3.1 Top-down technology.....	10
1.3.1.1 Physical crushing method	10
1.3.1.2 High-pressure homogenization	11
1.3.2 Bottom-up technology.....	11
1.3.2.1 Anti-solvent crystallization	11
1.3.2.2 Emulsification/Microemulsion method	12
1.3.2.3 Supercritical fluid crystallization	13
1.3.2.4 Spray drying	13
1.4 Bio-inspired crystallization	14
1.5 Propose and contents	17
Chapter 2 Crystallization mechanism of polymer-induced indomethacin microspheres.....	19
2.1 Introduction.....	19
2.2 Experiments.....	20
2.2.1 Reagents and instruments.....	20
2.2.2 Experimental method	22
2.2.2.1 Preparation of indomethacin microspheres	22
2.2.2.2 Crystallization mechanism of indomethacin microspheres	22
2.2.2.3 Characteration of indomethacin microspheres	23
2.2.2.4 Study of loading and release behavior on indomethacin microspheres.....	24
2.3 Results and Discussion.....	26

2.3.1 Standard curve of indomethacin in different medium.....	26
2.3.2 Morphology analysis.....	27
2.3.3 Optimization experiment of the indomethacin microspheres.....	29
2.3.4 Crystallization mechanism of indomethacin microspheres.....	30
2.3.5 Characterization of non covalent bond.....	35
2.3.6 Raman spectrum analysis.....	37
2.3.7 Study of loading and release behavior on indomethacin microspheres.....	38
2.4 Summary.....	40
Chapter 3 Crystallization mechanism of polymer-induced L-His self-assembled microspheres.....	41
3.1 Introduction.....	41
3.2 Experiments.....	42
3.2.1 Reagents and instruments.....	42
3.2.2 Experimental method.....	43
3.2.2.1 Preparation of L-His self-assembled microspheres.....	43
3.2.2.2 Crystallization mechanism of the L-His self-assembled microspheres.....	44
3.2.2.3 Characteration of L-His self-assembled microspheres.....	44
3.3 Results and Discussion.....	45
3.3.1 Morphology analysis.....	45
3.3.2 Optimization experiment of L-His self-assembled microspheres.....	46
3.3.4 Crystallization mechanism of L-His self-assembled microspheres.....	48
3.3.5 Characterization of non covalent bond.....	50
3.4 Summary.....	51
Chapter 4 Preparation of low density, high flexibility organic-organic hybrid films.....	52
4.1 Introduction.....	52
4.2 Experiments.....	53
4.2.1 Reagents and instruments.....	53
4.2.2 Experimental method.....	54
4.2.2.1 Preparation of L-His nanoplatelets.....	54
4.2.2.2 Preparation of different ratio of L-His/PVA hybrid films.....	55
4.2.2.3 Characteration of L-His/PVA hybrid films.....	55
4.3 Results and Discussion.....	56
4.3.1 Characteration of L-His nanoplatelets.....	56

4.3.2 Characteration of L-His/PVA hybrid films.....	56
4.3.3 Characterization of non covalent bond.....	58
4.4 Summary.....	59
Chapter 5 Conclusions and expectations	60
5.1 Conclusions.....	60
5.2 Expectations.....	61
References	62
Publications	74
Acknowledgements	75

第一章 绪论

1.1 引言

大多药物是以固体状态存在，而这些药物多为憎水分子，加之药物晶体内部存在有丰富的分子间氢键，致使该类药物在体内的溶解度和生物利用度很低，这严重制约了其作为药物制剂的效率甚至可行性。据估计，大约有 40% 以上的药物仅仅由于溶解度低而得不到最终的开发应用。目前，已有多种技术运用于改善水难溶性药物的生物利用度，包括通过微粉化的方法来提高药物的溶解度^[1]，采用助溶剂和胶束溶液来提高药物溶出特性^[2-4]，将难溶性药物与环糊精形成络合物^[5]及采用纳米脂质体系统作为亲脂性药物的输送载体等^[6]。虽然，这些技术能够有效提高药物的生物利用度，但引入了大量的添加剂，不但增大了制剂成本，又改变了药物本身的溶解特性。如果能够找到简便普适的方法来增大水难溶性药物的溶解度，将会有效提高其生物利用度。将药物做成纳米尺寸（一般需要小于 500 纳米）是一种普适的增加药物溶解度的方法^[7]。

近年来，众多关于难溶性药物制剂方面的研究表明，将水溶性差的药物通过结晶手段制备成纳米药物新剂型，不仅能够有效地提高该类药物在水体系中的溶解度和溶出特性，还能改善该类药物在体内的生物利用度。因此，该法已成为纳米药物制剂的一个新亮点^[8]。同时，纳米药物晶体不仅具有多样化的给药途径，而且制备工艺简单，绿色安全，易于产业化，为水难溶性药物的开发提供了广袤的空间。然而，现有纳米药物的制备技术仍存在如下三点不足：一是制剂过程需要大剂量的稳定剂；二是纳米药物不能长时间保持稳定；三是分离提纯困难。世界上著名大学和企业的研发机构已经就如何利用溶液结晶手段来达到提高现有难溶性药物的生物利用度的目的，展开了一系列的基础研究和相关技术开发，以实现开发载药量高和稳定性好的纳米结晶药物的目的。

1.2 经典药物结晶方法

1.2.1 结晶基本理论

结晶是固体晶体在自然或人工干预的条件下，自发的从溶液、熔融物或直接

从蒸汽中沉淀析出的过程。结晶也是一种固液分离纯化技术，相比于化学反应，晶体的析出主要是通过溶液中溶质的溶解度变化产生的^[8]。结晶单元操作是一种重要的分离和提纯工艺，因其制备工艺简单，绿色安全，产物纯度和稳定性良好等优势，已广泛运用于食品加工、制药工业、化工分离等领域。在结晶过程中，调控好晶体的尺寸、形貌以及晶型是至关重要的因素，因为它们均可以对下游分离纯化等操作过程产生至关重要的影响，同时也会影响到产物的物理和化学性质（如溶解速率和溶解度等）。尤其在医药行业中结晶操作是一个重要的分离纯化过程，常作为药物活性成分生产的最后一步。因此，结晶技术在制药工业中的应用愈加突显出其重要性，研究其过程就显得十分必要了。

1.2.1.1 结晶过程

结晶过程其实就是新相形成的过程，而要形成新相就必须要有能量的供给。当溶液中溶质的浓度超过其过饱和度时，便有晶体自发析出。因此，可以通过加热蒸发、降温冷却或使用添加剂等方法来改变溶质在相应溶剂中的溶解度，进而调控溶液的过饱和度使溶质结晶析出，所以过饱和度是调控结晶过程的关键因素。在结晶反应中成核过程即为形成晶核的过程，根据成核条件的不同又可细分为初级均相/非均相成核和二次成核等形式；所谓初级均相成核是指过饱和溶液在无晶粒存在时自发形成晶核的过程；若在粒子的诱发下溶液形成晶核的过程称为初级非均相成核；二次成核过程实质上也是非均相成核的一种形式，即指溶液中有晶体存在时的成核过程。当溶液中已形成晶核后，溶质分子或粒子会通过有序的紧密排列形成晶粒，即晶体的生长过程。除此之外，粒子的老化、团聚与破裂始终伴随着晶体生长的整个过程^[7, 9-12]。成核是一个新相形成的开始，它是决定晶体的存在形式以及粒度分布的关键所在；因此，掌握基本的成核理论对于调控结晶过程至关重要。

1.2.1.2 成核基本理论

1.2.1.2.1 经典成核理论

晶体生长的关键在于晶核的形成，在经典成核理论中，成核是一个相变过程，多组分体系最初是以单相存在的，通过调控温度，压力等边界条件使体系自由能

发生改变，从而使体系发生相分离。在 19 世纪末期，Gibbs 便已提出了相变自由能 (ΔG_v) 与表面能 (ΔG_s) 的变化共同决定了形成晶核的自由能 (ΔG)。其体系自由能的变化为：

$$\Delta G = \Delta G_v + \Delta G_s = 4/3\pi r^3 \Delta g_v + 4\pi r^2 \gamma \quad (1-1)$$

$$r^* = -2\gamma / \Delta g_v \quad (1-2)$$

ΔG — 晶核的自由能变化量；

ΔG_s — 表面自由能变化量；

ΔG_v — 体积自由能变化量；

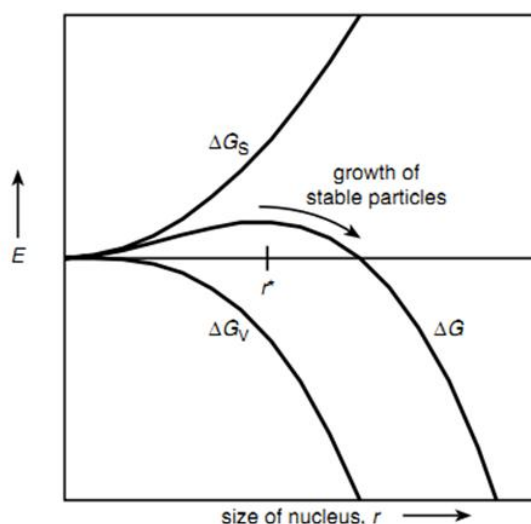
r — 晶核半径；

Δg_v — 两相间单位体积的自由能变化量；

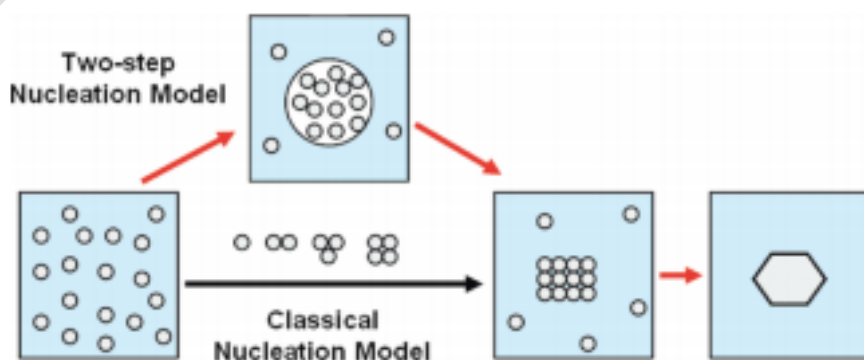
γ — 两相间的表面张力；

r^* — 临界成核半径。

晶核形成过程中，在过饱和溶液中的粒子（原子，离子，分子）间相互聚集融合形成团簇，首先形成一个固-液界面，由于该界面的存在使表面自由能升高（为正值），并和团簇半径的平方形成一定的比例关系。其次，在形成团簇的过程中促使粒子聚集融合的自由能是负值，并和团簇半径的立方成一定的比例关系。因此，对于半径越小的团簇，正的表面能越占有优势，会使总自由能增大，此时晶核不够稳定，进而发生溶解。这也是成核相变滞后现象产生的原因。对于溶液相体系来说，当溶质的浓度刚达到过饱和度或降低溶液温度至相变温度时，并未立马发生成核相变，因为只有溶液达到一定的过饱和度或过冷度时才能形成晶核（图 1-1）。当团簇的尺寸超过临界半径值 r^* 时，体系吉布斯自由能达到最大值，若再继续长大，体系吉布斯自由能将会逐渐下降，有利于团簇快速形成稳定的晶核^[7]。

图 1-1 成核时的吉布斯自由能图^[7]

但是在经典成核理论中仍然存在着几个基本限制条件。首先，该理论把临界晶核假设为球形液滴，视球形液滴的表面为一个无限的平面，并且忽略了与液滴曲率相关的表面张力。倘若临界晶核只有几个纳米的话，这些假设是不成立的。其次，经典成核理论假设团簇的生长不考虑分子间的相互作用而是由每次添加一个单体实现的，并且在成核过程中团簇有序且紧密地排布使形成的晶体与晶胞具有相同的结构。对于在溶液相中结晶来说这些假设是不足的，因为它忽略了两个至关重要的参数：密度和周期性的结构；这是区分新相和旧相不可或缺的参数^[13]。而且，在实际的晶体成核生长过程中团簇密度和周期性结构的变化也是有先后关系的，前者控制成核，是后者变化的先决条件。假若密度和周期性结构参数没有同步发生，那么经典成核理论将无法解释整个结晶过程，从而限制了该理论在实际中的应用。Wolde 和 Frenke^[14]等人对于结晶理论做了一系列的模拟和实验研究后提出了另一种晶体成核机制，称为两步成核机制（图 1-2）。

图 1-2 经典成核与两步成核模型图^[13]

1.2.1.2.2 两步成核理论

Vekilov 及其同事首次将两步成核理论用于蛋白质结晶的解释, 他们利用微分干涉差显微镜 (DIC) 成像技术直接监测血红蛋白溶液的液-液分离和晶体成核现象, 并发现血红蛋白的成核发生在一个具有高密度血红蛋白的液相密集区里^[15]。其他实验研究, 如动态/静态光散射^[16, 17], 差示扫描量热法^[18]和小角度 X 射线衍射技术^[19, 20]等均揭示了这种两步成核机制广泛存在于蛋白质^[16-18]、胶体颗粒^[19], 甚至是有机小分子^[20]的成核生长中。这些研究均表明, 在最初的成核阶段, 溶质分子在高密度区域迅速聚集形成不规则的团簇结构, 随后不断聚集成为紧凑有序排列的结构进而形成晶核, 这很好的支持了两步成核理论。Garetz 及其同事采用非光化学激光诱导成核 (NPLIN) 技术研究甘氨酸水溶液的结晶过程中发现过饱和的甘氨酸溶液在具有强烈纳秒脉冲的近红外激光的照射下, 可以通过转换线性和圆偏振来获得不同的甘氨酸晶型 (γ 和 R)^[21]。这些结果很难依靠经典成核理论进行解释, 因为经典成核理论描述晶核的形成过程是通过溶质分子有序连续聚集排布而成, 若用激光的照射将不会引起有序排列的团簇结构的取向变化, 从而导致不同晶型产物。

而且, Wolde 和 Frenke^[14]首次用计算机模拟了两步成核理论。他们使用 Monte Carlo 方法研究了 Lennard-Jones 体系的均相成核, 并证实了在临界成核点时, 首先形成高度无序液滴, 然后液滴内的分子发生调整形成超过一定临界尺寸的晶核。随后, Bolhuis^[22]及其同事通过使用过渡路径采样法确定 Lennard-Jones 体系中的临界晶核的结构和大小。他们的研究表明临界晶核可以是少而大或多而小的有序紧密排列的。这些大而少的临界晶核的存在再次确认了密度和周期性结构不一定需要同时发生。

1.2.1.2.3 非经典结晶理论

在过去的十几年内已有许多关于两步成核理论的研究, 然而, 成核路径的具体机制却很少被证明, 尤其是在第二步成核阶段, 很少关于分子在高密度的液滴中是如何重排的报道, 该步骤也被认为是晶体成核的限速步骤。近年来, 在生物矿化^[23]、纳米材料合成^[24]、仿生结晶^[25, 26]等领域已有不少关于结晶机制的研究, 揭示了在结晶过程中添加剂的使用能够将经典的成核生长过程转变成非经典的

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.